

明細書

フラバノン化合物及びその用途

5 技術分野

本発明は、新規フラバノン化合物、並びにフラバノン化合物を含有する抗酸化剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、飲食品、化粧品、医薬部外品、及び医薬品に関する。

背景技術

10 公知のフラバノン化合物としては、ニムフェオール (nymphaeol) -A、ニムフェオール-B、及びニムフェオール-Cが挙げられる。これら公知のフラバノン化合物に関しては、“K. Yakushijin, K. Shibayama, H. Murata and H. Furukawa, ハスノハギリ由来の新規プレニルフラバノン類 (New prenylflavanones from Hernandia nymphaefolia(presl) Kubitzki) , Heterocycles, 14, 397-402,

15 1980”、“W. R. Phillips, N. J. Baj, A. A. L. Gunatilaka and D. G. I. Kingston, ミゾホオズキ属由来のC-ゲラニル化合物 (C-Geranyl compounds from Mimulus clevelandii) , J. Nat. Prod., 59, 495-497, 1996”、及び“M. H. Tseng, C. H. Chou, Y. M. Chen and Y. H. Kuo, マハング落葉由来のアレロパシー作用を有するプレニルフラバノン類 (Allelopathic prenylflavanones from the fallen leaves of Macaranga tanarius) , J. Nat. Prod., 64, 827-828, 2001”を参照されたい。ニムフェオール-Aはハスノハギリ又はミゾホオズキ属から単離される。ニムフェオール-Bはハスノハギリから単離される。ニムフェオール-Cはハスノハギリ又はマハングから単離される。しかしながら、これらのフラバノン化合物が有する生理活性についてはこれまでほとんど解明されていない。

20

25

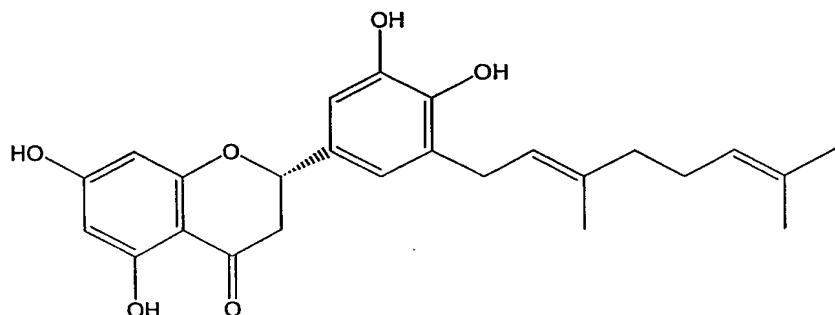
発明の開示

そこで本発明者らは、鋭意研究を重ねることによって、公知のフラバノン化合物が有する有用な生理活性を見出し、さらに、新規のフラバノン化合物を単離してその新規フラバノン化合物が有する有用な生理活性を見出した。本発明はこう

して得られた知見に基づくものであり、本発明の第1の目的は、飲食品や医薬品等の様々な用途に利用することが可能な新規フラバノン化合物を提供することにある。本発明の第2の目的は、公知又は新規のフラバノン化合物が有する有用な生理活性を利用したフラバノン化合物の用途を提供することにある。

5

上記の目的を達成するために、本発明の一態様では、構造式：



で表されるフラバノン化合物が提供される。

10 本発明の別の態様では、上記フラバノン化合物を含有する抗酸化剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、飲食品、化粧品、医薬部外品、及び医薬品が提供される。

15 本発明のさらに別の態様では、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種のフラバノン化合物を含有する抗酸化剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、飲食品、化粧品、医薬部外品、及び医薬品が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、実施例の化合物1の物理化学的特性をまとめた表である。

20 図2は、実施例の化合物1のNMRデータを示す表である。

図3は、実施例の化合物2の物理化学的特性をまとめた表である。

図4は、実施例の化合物2のNMRデータを示す表である。

図5は、実施例の化合物3の物理化学的特性をまとめた表である。

図6は、実施例の化合物3のNMRデータを示す表である。

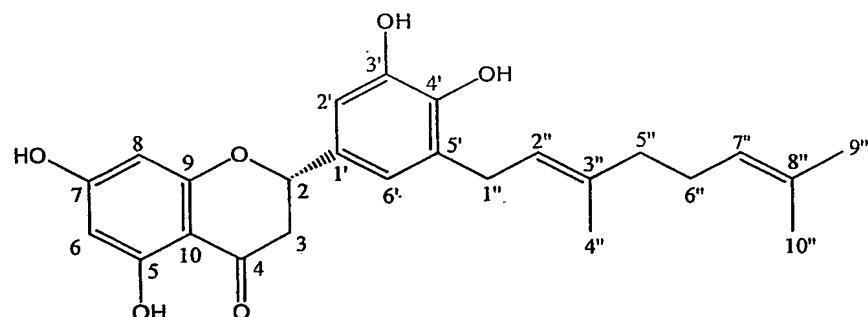
図7は、実施例の化合物4の物理化学的特性をまとめた表である。

図8は、実施例の化合物4のNMRデータを示す表である。

発明を実施するための最良の形態

5 以下、本発明の第1実施形態を説明する。

第1実施形態に係るフラバノン化合物は、5,7,3',4'-テトラヒドロキシ-5'-C-ゲラニルフラバノン (5,7,3',4'-tetrahydroxy-5'-C-geranylflavanone (isonymphaeol-B)) であって、構造式1：



10

で表される。

このフラバノン化合物は、分子式 $C_{25}H_{28}O_6$ 、分子量 424、融点 123～126°C である（図3参照）。このフラバノン化合物は、本発明者らによって沖繩産プロポリスから単離された天然物由来の新規化合物である。このフラバノン化合物は、エリオディクティオール (eriodictyol) と類似した構造的特徴を有しているが、5'位にC-ゲラニル基を備えていることからエリオディクティオールよりも親油性（膜透過性）が高い。

20 このフラバノン化合物は、エリオディクティオール及び α -トコフェロール (α -tocopherol) と同程度の高い抗酸化作用を有している。また、このフラバノン化合物は、乳癌細胞等の癌細胞の増殖を抑制する抗腫瘍作用を有している。さらに、このフラバノン化合物は、癌化しつつある異常細胞や細胞寿命を迎える老化細胞等の不要細胞を除去すべく、生理的な細胞死（アポトーシス；

apoptosis) を誘導する作用を有している。また、このフラバノン化合物は、黄色ブドウ球菌等のグラム陽性菌、バチルス属菌等の芽胞菌に対する抗菌作用を有している。

5 第1実施形態に係る抗酸化剤は、上記フラバノン化合物を有効成分（抗酸化成分）として含有するものである。この抗酸化剤は、油脂の酸化劣化、香料の劣化、色素の分解、色素の退色等の様々な製品の劣化（主に酸化劣化）を効果的に抑えるための劣化防止剤として飲食品中に添加して利用され得る。この抗酸化剤を含有した健康食品等の飲食品を経口摂取した生体内において、上記フラバノン
10 化合物は、活性酸素を消去して、肝機能の増強作用、アセトアルデヒドの毒性の軽減、低密度コレステロール（LDL）の抗酸化作用、乳癌細胞の増殖抑制作用、免疫機能改善等の健康増進効果を発揮する。この抗酸化剤は、化粧品又は医薬部外品中に含有させて利用することも可能であり、その場合には皮膚や口腔等の美白効果や老化の防止等に役立つ。

15

第1実施形態に係る抗菌剤は、上記フラバノン化合物を有効成分として含有するものである。この抗菌剤は、例えば飲食品中に添加して利用され、その場合には該飲食品の腐敗を防止する。この抗菌剤は、医薬品中に添加して利用されてもよいし、或いは感染症治療薬や抗菌性化学療法薬等の医薬品として利用されてもよい。この抗菌剤は、化粧品又は医薬部外品中に添加して利用されてもよく、その場合には皮膚、口腔、腋下等を清潔に保つのに役立つ。

20 この抗菌剤を飲食品、医薬品、化粧品、又は医薬部外品に添加して使用する場合、これらの製品中に含まれる上記フラバノン化合物の濃度は、好ましくは10 ppm以上、より好ましくは20 ppm以上、さらに好ましくは30～1000
25 0 ppm、特に好ましくは50～1000 ppmである。フラバノン化合物の濃度が10 ppm未満の場合には十分な抗菌作用が発揮されず、逆に10000 ppmを超える場合には不経済である。

第1実施形態に係る抗腫瘍剤は、上記フラバノン化合物を有効成分として含有するものであり、主に医薬品として利用される。癌細胞に作用するときのフラバノン化合物の濃度が好ましくは $0.1\text{ }\mu\text{M}\sim 100\text{ mM}$ 、より好ましくは $10\sim 1000\text{ }\mu\text{M}$ となるように、抗腫瘍剤の投与量は設定される。フラバノン化合物の濃度が $0.1\text{ }\mu\text{M}$ 未満の場合には治療効果が少なく、逆に 100 mM を超える場合には不経済である。

この抗腫瘍剤の投与量は、成人の場合、フラバノン化合物に換算して、1日当たり好ましくは $0.5\sim 10\text{ g}$ 、より好ましくは $2\sim 5\text{ g}$ である。1日当たりのフラバノン化合物の投与量が 0.5 g 未満の場合には抗腫瘍作用を十分に発揮されず、逆に 10 g を超える場合には不経済である。小人の場合は、1日当たりのフラバノン化合物の投与量は、成人の場合の半量程度が好ましい。

上記フラバノン化合物を飲食品（健康食品）、化粧品又は医薬部外品中に含有させた場合、それらの製品は、癌化しつつある異常細胞等の不要細胞の生理的な除去を促進することによって癌予防効果を発揮する製品としても利用することができる。この製品中のフラバノン化合物の濃度は、医薬品の場合の $1\sim 50\%$ 程度が好ましく、同 $10\sim 30\%$ 程度がより好ましい。

第1実施形態に係る飲食品は、上記フラバノン化合物を含有するものである。この飲食品は、上記抗酸化剤又は抗菌剤を含有するものであってもよい。飲食品中に含まれる上記フラバノン化合物の抗酸化作用のため、この飲食品は、生体内で活性酸素を消去して様々な健康増進効果を発揮する健康食品として利用することができる。飲食品中の上記フラバノン化合物はまた、劣化防止作用によって飲食品の劣化を防止して飲食品の保存性を向上させるか、或いは、抗菌作用によつて飲食品の腐敗を防止して飲食品の保存性を向上させる。そのため、この飲食品の品質は、長期間に渡って安定に維持されうる。飲食品中の上記フラバノン化合物はさらに、癌化しつつある異常細胞や細胞寿命を迎えつつある老化細胞等の不要細胞の生理的な除去を抗腫瘍作用によって促進する。従って、この飲食品は、

高い健康増進効果を発揮する健康食品として利用することもできる。

この飲食品の摂取量は、成人の場合、フラバノン化合物に換算して、1日当たり好ましくは0.05～10g、より好ましくは0.2～5gである。1日当たりのフラバノン化合物の摂取量が0.05g未満の場合には、フラバノン化合物による抗酸化作用が効果的に発揮されないおそれがあり、逆に10gを超える場合には不経済である。

第1実施形態は以下の利点を有する。

10

第1実施形態に係るフラバノン化合物は、上記構造式1で表される5,7,3',4'-テトラヒドロキシ-5'-C-ゲラニルフラバノン（イソニムフェオール-B）である。このフラバノン化合物は、抗酸化作用、抗腫瘍作用、抗菌作用等を有していることから、飲食品や医薬品を始めとする様々な種類の用途に利用することができる。特に、このフラバノン化合物は、単一の化合物でありながら複数種類の多面的な作用を同時に発揮することができ、プロポリスに代表されるような多機能健康食品素材としての利用が可能である点は注目に値する。また、このフラバノン化合物は、エリオディクティオールと同様な用途に利用できる他、エリオディクティオールよりも親油性が高いことを利用した様々な用途にも利用することができる。さらに、このフラバノン化合物は、健康食品素材として従来から利用されているプロポリス中に含有されているものであることから、経口摂取や経皮投与における問題もない。

第1実施形態に係る抗酸化剤は、高い抗酸化作用を有するフラバノン化合物を有効成分として含有している。そのため、この抗酸化剤は、飲食品、化粧品又は医薬部外品に添加された場合にはそれらの劣化を防止して保存性を向上させることができるとし、経口摂取又は経皮投与した場合には生体内において健康増進効果や老化防止効果を発揮することができる。

第1実施形態に係る抗菌剤は、高い抗菌作用を有するフラバノン化合物を有効成分として含有している。そのため、この抗菌剤は、飲食品、化粧品又は医薬部外品に添加された場合にはそれらの腐敗を防止して保存性を向上させることができるとし、化粧品又は医薬部外品として経皮投与した場合には高い衛生効果や消臭効果を発揮することができる。この抗菌剤はまた、医薬品としての利用も可能である。

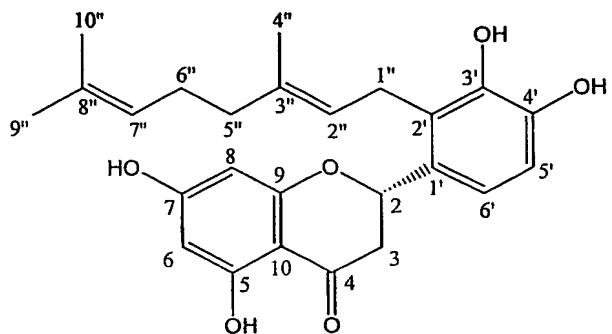
第1実施形態に係る抗腫瘍剤は、高い抗腫瘍作用を有するフラバノン化合物を有効成分として含有している。そのため、この抗腫瘍剤は、癌に対する高い治療効果を発揮することができるうえ予防効果も期待される。

第1実施形態に係る飲食品（飲料品又は食品）は、抗酸化作用、抗腫瘍作用、抗菌作用等を有するフラバノン化合物を含有している。そのため、この飲食品によれば、飲食品自体の劣化及び腐敗が防止されるだけでなく、生体内においては、健康増進効果、老化防止効果、新陳代謝増進効果、癌予防効果等、多面的に有用な効果が同時に発揮される。また、飲食品中のフラバノン化合物の含有量を比較的低く設定した場合には、フラバノン化合物の劣化防止作用又は腐敗防止作用によって保存性のみが向上した飲食品を容易に得ることができる。

以下、本発明の第2実施形態を説明する。

第2実施形態に係るフラバノン化合物は、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種を含有する。

ニムフェオールーBは、5,7,3',4'-テトラヒドロキシ-2'-C-ゲラニルフラバノン（5,7,3',4'-tetrahydroxy-2'-C-geranylflavanone）であって、構造式2：

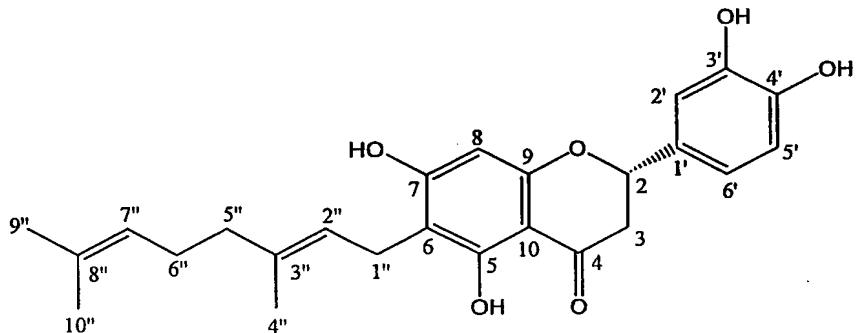


で表される。

ニムフェオールーBは、分子式 $C_{25}H_{28}O_6$ 、分子量424、融点(MP)80～83°Cである(図1参照)。ニムフェオールーBは、本発明者らによって沖縄産プロポリスから単離された天然物由来の有機化合物である。ニムフェオールーBは、エリオディクティオールと類似した構造的特徴を有しているが、2'位にC-ゲラニル基を備えていることからエリオディクティオールよりも親油性(膜透過性)が高い。

10

ニムフェオールーAは、5,7,3',4'-テトラヒドロキシ-6-C-ゲラニルフラavanone(5,7,3',4'-tetrahydroxy-6-C-geranylflavanone)であって、構造式3：



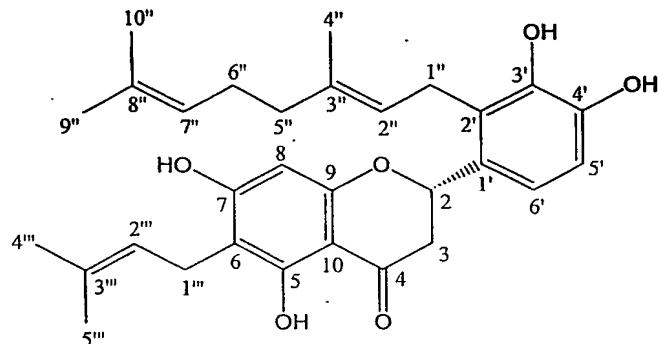
で表される。

15

ニムフェオールーAは、分子式 $C_{25}H_{28}O_6$ 、分子量424、融点(MP)172～175°Cである(図5参照)。ニムフェオールーAは、本発明者らによって沖縄産プロポリスから単離された天然物由来の有機化合物である。ニムフェオールーAは、エリオディクティオールと類似した構造的特徴を有しているが、6

位にC-ゲラニル基を備えていることからエリオディクティオールよりも親油性(膜透過性)が高い。

5 ニムフェオール-Cは、5,7,3',4'-テトラヒドロキシ-6-(3'',3'''-ジメチルアリル)-2'-C-ゲラニルフラバノン(5,7,3',4'-tetrahydroxy-6-(3'',3'''-dimethylallyl)-2'-C-geranylflavanone)であって、構造式4：



で表される。

10 ニムフェオール-Cは、分子式 $C_{30}H_{36}O_6$ 、分子量492である(図7参考)。ニムフェオール-Cは、本発明者らによって沖縄産プロポリスから単離された天然物由来の有機化合物である。ニムフェオール-Cは、エリオディクティオールと類似した構造的特徴を有しているが、6位に3'',3'''-ジメチルアリル基を備えるとともに2'位にC-ゲラニル基を備えている。このため、ニムフェオール-Cは、エリオディクティオール、ニムフェオール-A、及びニムフェオール-Bよりも親油性(膜透過性)が高い。

20 ニムフェオール-A、ニムフェオール-B、及びニムフェオール-Cはいずれも、エリオディクティオールや α -トコフェロールと同程度の高い抗酸化作用を有している。また、ニムフェオール-A、ニムフェオール-B、及びニムフェオール-Cはいずれも、乳癌細胞等の癌細胞の増殖を抑制する抗腫瘍作用を有している。ニムフェオール-A及びニムフェオール-Cの抗腫瘍作用は、ニムフェオール-Bに比べると高い。さらに、ニムフェオール-A、ニムフェオール-B、及びニムフェオール-Cはいずれも、癌化しつつある異常細胞や細胞寿命を迎える

つつある老化細胞等の不要細胞を除去するべく、生理的な細胞死（アポトーシス）を誘導する作用を有している。また、ニムフェオールーBは、黄色ブドウ球菌等のグラム陽性菌、バチルス属菌等の芽胞菌に対する抗菌作用を有している。ニムフェオールーA及びニムフェオールーCは、大腸菌等のグラム陰性菌、上記
5 グラム陽性菌及び芽胞菌に対する抗菌作用を有している。

第2実施形態に係る抗酸化剤は、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種を有効成分（抗酸化成分）として含有するものである。この抗酸化剤は、油脂の酸化劣化、香料の劣化、色
10 素の分解、色素の退色等の様々な製品の劣化（主に酸化劣化）を効果的に抑えるための劣化防止剤として飲食品中に添加して利用され得る。この抗酸化剤を含有した健康食品等の飲食品を経口摂取した生体内において、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCは、活性酸素を消去して、肝機能
15 の増強作用、アセトアルデヒドの毒性の軽減、低密度コレステロール（LDL）の抗酸化作用、乳癌細胞の増殖抑制作用、免疫機能改善等の健康増進効果を発揮する。この抗酸化剤は、化粧品又は医薬部外品中に含有させて利用することも可能であり、その場合には皮膚や口腔等の美白効果や老化の防止等に役立つ。

第2実施形態に係る抗菌剤は、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するものである。この抗菌剤は、例えば飲食品中に添加して利用され、その場合には該飲食品の腐敗を防止する。この抗菌剤は、医薬品中に添加して利用されてもよいし、或いは感染症治療薬や抗菌性化学療法薬等の医薬品として利用されてもよい。この抗菌剤は、化粧品又は医薬部外品中に添加して利用されてもよく、その
25 場合には皮膚、口腔、腋下等を清潔に保つのに役立つ。

この抗菌剤を飲食品、医薬品、化粧品、又は医薬部外品中に添加して使用する場合、これらの製品中に含まれるニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCの濃度の合計は、好ましくは10ppm以上、より好まし

くは15 p p m以上、さらに好ましくは30～10000 p p m、特に好ましくは50～1000 p p mである。この濃度の合計が50 p p m未満の場合には十分な抗菌作用が発揮されず、逆に10000 p p mを超える場合には不経済である。

5

第2実施形態に係る抗腫瘍剤は、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するものであり、主に医薬品として利用される。癌細胞に作用するときのニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCの濃度の合計が好ましくは0. 1 μM～100 mM、より好ましくは10～1000 μMとなるよう10に、抗腫瘍剤の投与量は設定される。この濃度の合計が0. 1 μM未満の場合には治療効果が少なく、逆に100 mMを超える場合には不経済である。

この抗腫瘍剤の投与量は、成人の場合、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCに換算して、1日当たり好ましくは0. 5～10 g、より好ましくは2～5 gである。ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCの1日当たりの投与量が0. 5 g未満の場合には抗腫瘍作用が十分に発揮されず、逆に10 gを超える場合には不経済である。小人の場合は、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーC20の1日当たりの投与量は、成人の場合の半量程度が好ましい。

ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種を飲食品（健康食品）、化粧品又は医薬部外品中に含有させた場合、それらの製品は、癌化しつつある異常細胞等の不要細胞の生理的な除去25を促進することによって癌予防効果を発揮する製品としても利用することもできる。この製品中のニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCの濃度の合計は、医薬品の場合の1～50%程度が好ましく、同10～30%程度がより好ましい。

第2実施形態に係る飲食品は、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種を含有するものである。この飲食品は、上記抗酸化剤又は抗菌剤を含有するものであってもよい。飲食品中に含まれるニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCの抗酸化作用のため、この飲食品は、生体内で活性酸素を消去して様々な健康増進効果を発揮する健康食品として利用することができる。飲食品中のニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCフラバノンはまた、劣化防止作用によって飲食品の劣化を防止して飲食品の保存性を向上させるか、或いは、抗菌作用によって飲食品の腐敗を防止して飲食品の保存性を向上させる。そのため、この飲食品の品質は、長期間に渡って安定に維持されうる。飲食品中のニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCはさらに、癌化しつつある異常細胞や細胞寿命を迎えてつつある老化細胞等の不要細胞の生理的な除去を抗腫瘍作用によって促進する。従って、この飲食品は、高い健康増進効果を発揮する健康食品として利用することもできる。

15

この飲食品の摂取量は、成人の場合、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCに換算して、1日当たり好ましくは0.05～10g、より好ましくは0.2～5gである。1日当たりの摂取量が0.05g未満の場合には、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCによる抗酸化作用が効果的に発揮されないおそれがあり、逆に10gを超える場合には不経済である。

第2実施形態は以下の利点を有する。

25 ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCはいずれも、抗酸化作用、抗腫瘍作用及び抗菌作用を有していることから、飲食品や医薬品を始めとする様々な種類の用途に利用することができる。特に、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCは、単一の化合物でありながら複数種類の多面的な作用を同時に発揮することができ、プロポリスに代表

されるような多機能健康食品素材としての利用が可能である点は注目に値する。また、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCは、エリオディクティオールと同様な用途に利用できる他、エリオディクティオールよりも親油性が高いことを利用した様々な用途にも利用することができる。さらに、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCは、健康食品素材として利用されているプロポリス中に含有されているものであることから、経口摂取や経皮投与における問題もない。

第2実施形態に係る抗酸化剤は、高い抗酸化作用を有するニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも一種を有効成分として含有している。そのため、この抗酸化剤は、飲食品、化粧品又は医薬部外品に添加された場合にはそれらの劣化を防止して保存性を向上させることができるし、経口摂取又は経皮投与した場合には生体内において健康増進効果や老化防止効果を発揮することができる。

15

第2実施形態に係る抗菌剤は、高い抗菌作用を有するニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも一種を有効成分として含有している。そのため、この抗菌剤は、飲食品、化粧品又は医薬部外品に添加された場合にはそれらの腐敗を防止して保存性を向上させることができるとし、化粧品又は医薬部外品として経皮投与した場合には高い衛生効果や消臭効果を発揮することができる。この抗菌剤はまた、医薬品としての利用も可能である。

第2実施形態に係る抗腫瘍剤は、高い抗腫瘍作用を有するニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも一種を有効成分として含有している。そのため、この抗腫瘍剤は、癌に対する高い治療効果を発揮することができるうえ予防効果も期待される。

第2実施形態に係る飲食品（飲料品又は食品）は、抗酸化作用、抗腫瘍作用、

抗菌作用等を有するニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも一種を含有している。そのため、この飲食品によれば、飲食品自体の劣化及び腐敗が防止されるだけでなく、生体内においては、健康増進効果、老化防止効果、新陳代謝増進効果、癌予防効果等、多面的で
5 有用な効果が同時に発揮される。また、飲食品中のニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCの含有量を比較的低く設定した場合には、ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCの劣化防止作用又は腐敗防止作用によって保存性のみが向上した飲食品を容易に得ることができる。

10

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

<化合物の単離>

沖縄産プロポリス原体50gにエタノール500mlを加え、数分間超音波処理を行った。一晩室温で攪拌した後、ろ過を行なって残留物を取り除き、得られた抽出液を減圧濃縮することによりエタノール抽出物39.73gを得た。次に、前記エタノール抽出物を以下の条件のカラムクロマトグラフィーに供し、下記(1)～(11)の各溶出溶媒で溶出される11の画分を得た。

20 カラム管：ガラスカラム 5.0×45cm

充填剤：シリカゲル 約590cm³

溶出溶媒：(1) ヘキサン：酢酸エチル=90：10 (350ml)

(2) ヘキサン：酢酸エチル=80：20 (220ml)

(3) ヘキサン：酢酸エチル=70：30 (250ml)

25 (4) ヘキサン：酢酸エチル=60：40 (1000ml)

(5) ヘキサン：酢酸エチル=50：50 (200ml)

(6) ヘキサン：酢酸エチル=40：60 (100ml)

(7) ヘキサン：酢酸エチル=30：70 (100ml)

(8) ヘキサン：酢酸エチル=20：80 (100ml)

(9) ヘキサン：酢酸エチル=10：90 (100ml)

(10) 酢酸エチル (200ml)

(11) メタノール (700ml)

得られた各画分を下記HPLC条件1で分析したところ、(4)の溶出溶媒で
5 溶出された画分(第4画分)に4つの主要成分が含まれていることが確認され
た。

HPLC条件1

カラム : YMC-Pack R&D ODS (4.6×250mm)

10 溶媒 : A:水(2%酢酸)、B:アセトニトリル(2%酢酸)

溶出条件 : 0-60min (グラジエント溶出；A:B=80:20 → A:B=20:80)

流速 : 1 ml/min

検出 : UV 280 nm

15 次に、第4画分を用いて下記HPLC条件2にて分取・精製を行なうことにより、化合物1(収量6.1.1mg)、化合物2(収量6.5.7mg)、及び化合物3(収量9.9.8mg)を単離した。さらに、第4画分を用いて下記HPLC条件3にて分取・精製を行なうことにより、化合物4(収量20.0mg)を単離した。

20

HPLC条件2

カラム : YMC-Pack R&D ODS (20×250mm)

溶媒 : 水(0.1%TFA) : アセトニトリル(0.1%TFA) = 40 : 60

流速 : 9 ml/min

25 検出 : UV 280 nm

HPLC条件3

カラム : YMC-Pack R&D ODS (20×250mm)

溶媒 : 水(0.1%TFA) : アセトニトリル(0.1%TFA) = 20 : 80

流速 : 9 ml/min

検出 : UV 280 nm

<化合物 1～4 の同定>

5 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、MS、IR、UVスペクトル等により上記化合物 1～4 の構造を解析した。

(化合物 1 : Compound 1)

化合物 1 の物理化学的特性を図 1 に示す。ESI-MS による測定から化合物 10 化合物 1 の分子量は 424 と確認された。IRスペクトルからは 3420 cm^{-1} に水酸基、 1680 cm^{-1} にカルボニル基の存在が示唆された。また UVスペクトルにおいて、フラバノンあるいはフラバノールに特徴的なスペクトルを示したので、化合物 1 はフラバノン骨格を有すると推定された。 ^1H -NMRスペクトルの積分値からは 28 個のプロトンの存在が確認され、 ^{13}C -NMRスペクトルでは 25 本のシグナルが観測された。DEPTスペクトルにより、3 個のメチル、4 個のメチレン、7 個のメチン、及び 11 個の 4 級炭素が確認された。以上の結果から化合物 1 の分子式を $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_6$ と推定した。さらに、HSQCスペクトル、 ^1H - ^1H COSY、HMQCスペクトル、CDスペクトル等に関する図 2 に示す NMR データから、化合物 1 を、上記構造式 2 で表される nymphaeol-B(5, 7, 3', 4'-tetrahydroxy-2'-C-geranylflavanone) であると同定した。本化合物はハスノハギリからの単離は既に報告されているが、プロポリスからの単離は本研究が初めてである。

(化合物 2 : Compound 2)

25 化合物 2 の物理化学的特性を図 3 に示す。ESI-MS による測定から化合物 2 の分子量は 424 と確認された。IRスペクトルからは 3360 cm^{-1} に水酸基、 1680 cm^{-1} にカルボニル基の存在が示唆された。また UVスペクトルにおいて、フラバノンあるいはフラバノールに特徴的なスペクトルを示したので、化合物 2 はフラバノン骨格を有すると推定された。 ^1H -NMRスペクトルの積分

値からは28個のプロトンの存在が確認され、 ^{13}C -NMRスペクトルでは25本のシグナルが観測された。DEPTスペクトルにより、3個のメチル、4個のメチレン、8個のメチン、及び11個の4級炭素の存在が確認された。以上の結果から化合物2の分子式を $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_6$ と推定した。さらに、HSQCスペクトル、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY、HMB Cスペクトル、CDスペクトル等に関する図4に示すNMRデータから、化合物2を、上記構造式1で表される 5, 7, 3', 4'-tetrahydroxy-5'-C-geranylflavanone であると同定した。本化合物はこれまで文献等未記載の新規化合物であった。

10 (化合物3 : Compound 3)

化合物3の物理化学的特性を図5に示す。ESI-MSによる測定から化合物3の分子量は424と確認された。IRスペクトルからは 3380 cm^{-1} に水酸基、 1680 cm^{-1} にカルボニル基の存在が示唆された。またUVスペクトルにおいて、フラバノンあるいはフラバノールに特徴的なスペクトルを示したので、化合物3はフラバノン骨格を有すると推定された。 ^1H -NMRスペクトルの積分値からは28個のプロトンの存在が確認され、 ^{13}C -NMRスペクトルでは25本のシグナルが観測された。DEPTスペクトルにより、3個のメチル、4個のメチレン、7個のメチン、及び11個の4級炭素の存在が確認された。以上の結果から化合物3の分子式を $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_6$ と推定した。さらに、HSQCスペクトル、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY、HMB Cスペクトル、CDスペクトル等に関する図6に示すNMRデータから、化合物3を、上記構造式3で表される nymphaeol-A(5, 7, 3', 4'-tetrahydroxy-6-C-geranylflavanone) であると同定した。本化合物はハスノハギリおよびミゾホオズキ属からの単離は既に報告されているが、プロポリスからの単離は本研究が初めてである。

25

(化合物4 : Compound 4)

化合物4の物理化学的特性を図7に示した。FAB-MSによる測定から化合物4の分子量は492と確認された。IRスペクトルからは 3400 cm^{-1} に水酸基、 1640 cm^{-1} にカルボニル基の存在が示唆された。またUVスペクトル

において、フラバノンあるいはフラバノールに特徴的なスペクトルを示したので、化合物4はフラバノン骨格を有すると推定された。¹H-NMRスペクトルの積分値からは36個のプロトンの存在が確認され、¹³C-NMRスペクトルでは30個のカーボンの存在が推定された。DEPTスペクトルにより、5個のメチル、5個のメチレン、7個のメチレン、及び13個の4級炭素の存在が確認された。以上の結果から化合物4の分子式をC₃₀H₃₆O₆と推定した。さらに、HSQCスペクトル、¹H-¹H COSY、HMQCスペクトル、CDスペクトル等に関する図8に示すNMRデータから、化合物4を、上記構造式4で表されるnymphaeol-C(5,7,3',4'-tetrahydroxy-6-(3'',3'''-dimethylallyl)-2'-C-geranylflavanone)であると同定した。本化合物はハスノハギリおよびマハング(Macaranga tanarius)からの単離は既に報告されているが、プロポリスからの単離は本研究が初めてである。

<プロポリス中の含有量の測定>

上記化合物1～4が沖縄産プロポリス中にどれだけ含まれているかを下記HPLC条件4にて分析し含有量を求めた。その結果、沖縄産プロポリス原体100g中に化合物1は12.7g、化合物2は10.5g、化合物3は13.5g、化合物4は9.1g含有されていることが確認された。

20 HPLC条件4

カラム : YMC-Pack R&D ODS (4.6×250mm)

溶媒 : A:水(0.1%TFA)、B:アセトニトリル(0.1%TFA)

溶出条件 : 0-50min (グラジエント溶出 ; A:B=65:35 → A:B=0:100)

流速 : 1ml/min

25 検出 : UV 280 nm

<DPHラジカル捕捉活性試験>

DPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydralil)は517nmに極大吸収を持つ紫色の安定ラジカルであり、水素を得ることにより無色のヒドラジンになる。

この呈色反応を利用して化合物 1～4 等のラジカル捕捉活性を測定した。即ち、化合物 1～4 のそれぞれをエタノールに溶解することにより濃度 25 μM の試料溶液を 3 mL 調製した。続いて、各試料溶液に 0.5 mM の DPPH 溶液（溶媒はエタノール）を 0.75 mL 加えて攪拌し、暗所にて 1 時間反応させた後に 5 17 nm における吸光度を測定した。また、化合物 1～4 の代わりに BHT (butylated hydroxytoluene)、α-トコフェロール、又はエリオディクティオールを用いて上記と同様の手順で吸光度を測定した。さらに、コントロールとして、前記試料溶液の代わりにエタノールを用いて上記と同様の手順で吸光度を測定した。そして、各物質のラジカル捕捉活性（%）を下記計算式 1 にて算出した。その結果を下記表 1 に示す。なお、表 1 に示す値はいずれも、三回の試験で得られた値の平均値及び標準偏差である。

計算式 1

$$15 \quad \text{ラジカル捕捉活性} = \frac{\text{コントロールの吸光度} - \text{試料溶液の吸光度}}{\text{コントロールの吸光度}} \times 100$$

表 1

試料	DPPH ラジカル捕捉活性試験 ラジカル捕捉活性（%）	β-カロテン退色試験 抗酸化活性（%）
化合物 1	55.35 ± 0.43	85.54 ± 2.24
化合物 2	49.86 ± 0.96	78.07 ± 1.79
化合物 3	64.00 ± 0.58	60.62 ± 1.16
化合物 4	50.79 ± 0.08	80.06 ± 0.29
BHT	28.51 ± 7.48	85.02 ± 1.89
α-トコフェロール	58.87 ± 1.24	93.00 ± 0.73
エリオディクティオール	68.82 ± 1.12	81.47 ± 2.48

20 表 1 の結果より、化合物 1～4 はいずれも BHT よりも高いラジカル捕捉活性を有し、さらに α-トコフェロールとほぼ同程度のラジカル捕捉活性を有することが明らかとなった。中でも化合物 3 は最も高いラジカル捕捉活性を有し、その活性はエリオディクティオールとほぼ同等であった。化合物 1, 3, 4 は既知物質であるが、これらの化合物のラジカル捕捉活性に関する検討は従来なされてお

らず、これらの化合物が非常に高いラジカル捕捉活性を有することは本研究で初めて明らかにされた。

< β -カロテン退色試験 >

5 β -カロテンは、リノール酸の自動酸化によって生じるリノール酸過酸化物が
 β -カロテンの二重結合と反応することにより退色する。この現象を利用して化
合物 1 ~ 4 等の抗酸化活性を測定した。即ち、まず、200 mg / ml の Tween 4
0 クロロホルム溶液 2 ml、100 mg / ml のリノール酸クロロホルム溶液
0.4 ml、及び 0.1 mg / ml の β -カロテンクロロホルム溶液 3 ml を混
合した後、窒素ガスを用いて溶媒を除去した。続いて、蒸留水 100 ml を加え
10 十分に攪拌することによりエマルジョンを得た。このエマルジョン 3 ml にエタ
ノールを加え溶質を溶媒中に完全に溶解させた。その後、化合物 1 ~ 4 のそれぞ
れをエタノールに溶解することにより調製された濃度 1.2 mM の試料溶液 50
 μ l を混合して反応液（試料反応液）を調製した。このとき反応液中の化合物 1
15 ~ 4 の濃度は 20 μ M である。反応液を 60 °C で 60 分間インキュベートし、イ
ンキュベート前の反応液とインキュベート後の反応液とについて 470 nm の吸
光度を測定した。また、化合物 1 ~ 4 の代わりに BHT、 α -トコフェロール、
又はエリオディクティオールを用いて上記と同様の手順でインキュベート前後の
反応液の吸光度を測定した。さらに、コントロールとして、試料溶液を含まない
20 反応液（コントロール反応液）を調製し、上記と同様の手順でインキュベート前
後の反応液の吸光度を測定した。抗酸化活性（%）は下記計算式 2 により求め
た。その結果を上記表 1 に示す。なお、表 1 に示す値はいずれも、三回の試験で
得られた値の平均値及び標準偏差である。

25 計算式 2

$$\text{抗酸化活性} = \frac{\text{コントロールの退色速度} - \text{試料溶液の退色速度}}{\text{コントロールの退色速度}} \times 100$$

30 但し、計算式 2において、コントロールの退色速度は、インキュベート前のコ

ントロール反応液の吸光度をインキュベート後のコントロール反応液の吸光度で除し、さらに60で除して得られる値の自然対数である。また、試料溶液の退色速度は、インキュベート前の試料反応液の吸光度をインキュベート後の試料反応液の吸光度で除し、さらに60で除して得られる値の自然対数である。

5

表1の結果より、化合物2は、BHT、 α -トコフェロール及びエリオディクティオールとほぼ同等の高い抗酸化活性を有することが確認された。

表1の結果より、化合物1～4はいずれも高い抗酸化活性を有し、特に化合物10 1, 2, 4は、BHT、 α -トコフェロール及びエリオディクティオールとほぼ同等の高い抗酸化活性を有することが確認された。化合物1, 3, 4は既知物質であるが、これらの化合物の抗酸化活性に関する検討は従来なされておらず、これらの化合物が非常に高い抗酸化活性を有することは本研究で初めて明らかにされた。

15

<乳癌細胞増殖抑制試験>

乳癌細胞(MCF-7)を培養する際に細胞増殖促進作用のあるエストラジオール(17β -Estradiol)を添加すると、短期間で簡易的に乳癌細胞の増殖を進めることができる。この現象を利用して、化合物1～4等が乳癌細胞の増殖を抑制する効果を調べた。即ち、まず、化合物1～4のそれぞれをジメチルスルフォキシドに希釈して試料溶液を作製した。次に、96ウェルプレートの各ウェルに 2×10^3 個の乳癌細胞(MCF-7)を播種し、4時間後にエストラジオール及び試料溶液を添加した。エストラジオールは終濃度で0.1nM、試料溶液は終濃度で0.2 μ M、2 μ M、又は20 μ Mになるように、各区分にそれぞれ添加した。所定期間(3日又は5日)の培養の後、培地を交換して酵素溶液(Cell counting Kit-8: Wako)を培地の10%量加えた。インキュベーターにて37°Cで2時間保持した後、分光光度計で波長450nm(参照波長630nm)の吸光度を測定して各区分における生細胞数を定量した。

なお、培養期間が 5 日の区分では、培養 3 日目に培地を交換した後、エストラジオール及び試料溶液を添加して 5 日目まで培養を継続させた。培養期間が 0 日目の区分では、細胞を播種して 4 時間後に酵素溶液を添加し、インキュベーターにて 37 °Cで 2 時間保持した後に吸光度を測定した。

5

化合物 1～4 の代わりにエリオディクティオールを用いて上記と同様の手順で吸光度を測定し、各区分における生細胞数を定量した。また、コントロール 1 として、エストラジオール及び試料を加えないで上記と同様の手順で吸光度を測定して各区分における生細胞数を定量し、コントロール 2 として、試料を加えないで上記と同様の手順で吸光度を測定して各区分における生細胞数を定量した。

10

コントロール 1 の 0 日目において定量される生細胞数を 1 としたときの上記各試験で定量された生細胞数の相対値を表 2 に示す。なお、表 2 に示す値はいずれも、8 つのウェルで得られた値の平均値及び標準偏差である。

15

表 2

試料	生細胞数の相対値		
	培養 0 日目	培養 3 日目	培養 5 日目
コントロール 1	1.00 ± 0.07	2.45 ± 0.12	3.29 ± 0.08
コントロール 2 (0.1nM エストラジオール)	0.97 ± 0.04	3.12 ± 0.34	7.02 ± 0.99
エリオディクティオール	0.2 μM	0.96 ± 0.04	2.88 ± 0.22
	2 μM	0.98 ± 0.07	2.90 ± 0.13
	20 μM	1.01 ± 0.05	2.54 ± 0.30
化合物 1	0.2 μM	0.98 ± 0.04	2.86 ± 0.14
	2 μM	0.99 ± 0.05	2.58 ± 0.11
	20 μM	1.01 ± 0.05	2.22 ± 0.19
化合物 2	0.2 μM	0.95 ± 0.04	2.97 ± 0.37
	2 μM	0.99 ± 0.04	2.68 ± 0.19
	20 μM	1.00 ± 0.07	2.59 ± 0.21
化合物 3	0.2 μM	0.99 ± 0.05	2.94 ± 0.20
	2 μM	1.01 ± 0.05	2.53 ± 0.30
	20 μM	0.96 ± 0.04	1.21 ± 0.22
化合物 4	0.2 μM	0.99 ± 0.04	2.97 ± 0.27
	2 μM	1.00 ± 0.07	3.03 ± 0.30
	20 μM	0.98 ± 0.04	1.27 ± 0.20
			1.01 ± 0.12

表2の結果からは、若干の差はあるものの、化合物1～4のいずれもが乳癌細胞の増殖を抑制する効果を有することが認められた。また、乳癌細胞の増殖を抑制する化合物1～4の効果は濃度依存的であることが分かった。特に化合物3, 4を20 μM添加した区分では、コントロール1よりも強い乳癌細胞増殖抑制効果（乳癌細胞に対する細胞毒性）が認められた。化合物1, 3, 4は既知物質であるが、これらの化合物の癌細胞増殖抑制作用に関する検討は従来なされておらず、これらの化合物が非常に高い抗腫瘍活性を有していることは本研究で初めて明らかにされた。

10 <エタノール抽出物を用いた抗菌活性試験>

グラム陰性菌の指標菌として *E. coli* (IF03366)、グラム陽性菌の指標菌として *Staphylococcus aureus* (IF015035)、熱殺菌等の工程にも耐性を有する芽胞菌の指標菌として *Bacillus cereus* (IF015305T)、及び缶詰における変敗の原因となる菌類の指標菌として変敗缶詰から分離した *Bacillus coagulans* を用い、化合物1～4の抗菌活性を評価した。即ち、まず、プロポリス原体のエタノール抽出物（<化合物の単離>欄参照。）を70%エタノールに溶解させた後、該抽出物の濃度が0 ppm、12.5 ppm、25 ppm、50 ppm、100 ppm、又は150 ppmになるように調製した標準寒天培地を作製した。続いて、これらの標準寒天培地をオートクレーブ殺菌することにより評価培地を作製し、これらの評価培地に上記の指標菌をそれぞれ接種してその生育を確認した。その結果、エタノール抽出物の濃度が高くなるにつれて、より強く指標菌の生育が阻害されることが確認された。特に、エタノール抽出物の濃度が30 ppm以上や50 ppm以上のときには、いずれの指標菌も培地から検出されなかった。なお、70%エタノールが各指標菌の生育に殆ど影響しないことは前もって確認済みである。

<化合物1～4を用いた抗菌活性試験>

グラム陰性菌の指標菌として *E. coli* 及び *Salmonella enteritidis* (S. en; NBRC3313)、グラム陽性菌の指標菌として *Staphylococcus aureus* (Sta.)、及び

芽胞菌の指標菌として *Bacillus cereus* (B.ce) を用い、化合物 1 ~ 4 の抗菌活性を評価した。即ち、まず、化合物 1 ~ 4 のそれぞれを 70 % エタノールに溶解させた後、該化合物の濃度が 0 ppm、5 ppm、10 ppm、15 ppm、20 ppm、又は 50 ppm になるように調製した標準寒天培地を作製した。続いで、これらの標準寒天培地をオートクレーブ殺菌することにより評価培地を作製し、これらの評価培地に上記の指標菌を接種した。各菌を培養した後、1 シャーレ当たりの菌数 (CFU/シャーレ) を測定した。その結果を表 3 及び表 4 に示す。

10 表 3

試料濃度	菌数(CFU/シャーレ)			
	グラム陰性菌		グラム陽性菌	芽胞菌
	E.coli	S.en	Sta.	B.ce
0ppm	>3000	>3000	470	13
化合物 1	5ppm	>3000	344	12
	10ppm	>3000	36	0
	15ppm	>3000	0	0
	20ppm	>3000	0	0
	50ppm	>3000	0	0
化合物 2	5ppm	>3000	395	17
	10ppm	>3000	108	0
	15ppm	>3000	22	0
	20ppm	>3000	0	0
	50ppm	>3000	0	0

表 4

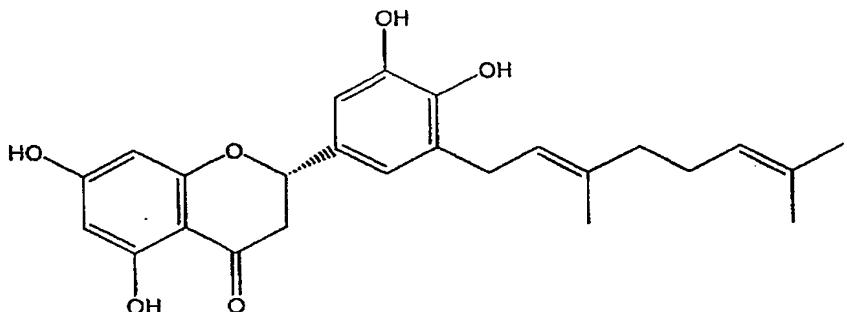
試料濃度	菌数(CFU/シャーレ)			
	グラム陰性菌		グラム陽性菌	芽胞菌
	E.coli	S.en	Sta.	B.ce
0ppm	5	221	202	183
化合物 3	5ppm	3	296	22
	10ppm	1	207	0
	15ppm	0	116	0
	20ppm	0	143	0
	50ppm	0	43	0
化合物 4	5ppm	6	249	26
	10ppm	6	199	7
	15ppm	9	225	10
	20ppm	6	132	1
	50ppm	0	65	0

表3の結果より、化合物1又は化合物2の濃度が高くなるにつれて、グラム陽性菌及び芽胞菌の生育がより強く阻害されることが分かった。また、化合物1及び化合物2の濃度がいずれの場合でも、E.coli 及び S.en は殆ど影響されないことも分かった。また、化合物1又は化合物2を抗菌成分として飲食品、医薬品、化粧品又は医薬部外品に含有させる場合には、これらの製品中の化合物1又は化合物2の濃度は、10 ppm以上が好ましく、15 ppm以上がより好ましいことも、この結果から分かる。

表4の結果からは、化合物3及び化合物4は全ての指標菌に対して抗菌活性を有しており、特に E.coli、Sta. 及び B.ce に対して高い抗菌活性を有していることが認められた。また、化合物3を抗菌成分として飲食品、医薬品、化粧品又は医薬部外品に含有させる場合には、これらの製品中の化合物3の濃度は10 ppm以上が好ましく、15 ppm以上がより好ましいことも、この結果から分かる。さらには、化合物4を抗菌成分として飲食品、医薬品、化粧品又は医薬部外品に含有させる場合には、これらの製品中の化合物4の濃度は10 ppm以上が好ましく、50 ppm以上がより好ましいことも、この結果から分かる。なお、70%エタノールが各指標菌の生育に殆ど影響しないことは前もって確認済みである。

請求の範囲

1. 構造式：



5 で表されることを特徴とするフラバノン化合物。

2. 請求項1に記載のフラバノン化合物を含有することを特徴とする抗酸化剤。

10 3. 請求項1に記載のフラバノン化合物を含有することを特徴とする抗菌剤。

4. 請求項1に記載のフラバノン化合物を含有することを特徴とする抗腫瘍剤。

15 5. 請求項1に記載のフラバノン化合物を含有することを特徴とする飲食品。

6. 飲食品に含まれる前記フラバノン化合物の濃度が50 ppm以上であることを特徴とする請求項5に記載の飲食品。

20 7. 飲食品に含まれる前記フラバノン化合物の濃度が50～1000 ppmであることを特徴とする請求項5に記載の飲食品。

8. 請求項1に記載のフラバノン化合物を含有することを特徴とする化粧品。

9. 請求項 1 に記載のフラバノン化合物を含有することを特徴とする医薬部外品。

10. 請求項 1 に記載のフラバノン化合物を含有することを特徴とする医薬品。

11. ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも 1 種のフラバノン化合物を含有することを特徴とする抗酸化剤。

10

12. ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも 1 種のフラバノン化合物を含有することを特徴とする抗菌剤。

15

13. ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも 1 種のフラバノン化合物を含有することを特徴とする抗腫瘍剤。

20

14. ニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも 1 種のフラバノン化合物を含有することを特徴とする飲食品。

15. 飲食品に含まれる前記フラバノン化合物の濃度が 30 p p m 以上であることを特徴とする請求項 14 に記載の飲食品。

25

16. 飲食品に含まれるフラバノン化合物の濃度が 30 ~ 1000 p p m であることを特徴とする請求項 14 に記載の飲食品。

17. ニムフェオールーA、ニムフェオールーB 及びニムフェオールーC から

選ばれる少なくとも1種のフラバノン化合物を含有することを特徴とする化粧品。

18. ニムフェオールーA、ニムフェオールーB及びニムフェオールーCから
5 選ばれる少なくとも1種のフラバノン化合物を含有することを特徴とする医薬部外品。

19. ニムフェオールーA、ニムフェオールーB及びニムフェオールーCから
10 選ばれる少なくとも1種のフラバノン化合物を含有することを特徴とする医薬品。

图 1

Compound 1 – 物理化学的特性.

Appearance	white powder
Molecular formula	C ₂₅ H ₂₈ O ₆
ESI-MS (m/z)	
Positive:	425.3 (M+H) ⁺
Negative:	423.5 (M-H) ⁻
UV λ _{max} ^{MeOH} nm (ε)	288.5 (19,674)
IR (KBr) cm ⁻¹	3420, 2960, 2920, 1680, 1600, 1160
[α] _D ²⁴ (c 0.2, MeOH)	-5.8°
[α] _D ²⁵ (c 0.2, CHCl ₃)	+20.0°
MP	80~83°C
CD (MeOH) θ /deg	8470 (330), -46997 (290), 12833 (255)

図 2

NMR データ (Compound 1 in acetone-d₆).

Position	¹³ C		¹ H	
2	77.21	CH	5.62	(1H, dd), <i>J</i> =2.9, 11.8 Hz
3	43.26	CH ₂	2.66	(1H, dd), <i>J</i> =2.9, 17.2 Hz
			3.17	(1H, dd), <i>J</i> =11.8, 17.2 Hz
4	197.59	C		_____
5	165.29	C	12.19	(-OH, s)
6	95.83	CH	5.96	(1H, s)
7	167.27	C		_____
8	96.79	CH	5.96	(1H, s)
9	164.65	C		_____
10	103.12	C		_____
1'	129.77	C		_____
2'	127.71	C		_____
3'	144.08	C		_____
4'	145.56	C		_____
5'	113.49	CH	6.82	(1H, d), <i>J</i> =8.3 Hz
6'	118.55	CH	6.96	(1H, d), <i>J</i> =8.3 Hz
1''	25.15	CH ₂	3.55	(2H, d), <i>J</i> =6.3 Hz
2''	124.15	CH	5.18	(1H, t), <i>J</i> =6.3 Hz
3''	135.33	C		_____
4''	16.34	CH ₃	1.68	(3H, s)
5''	40.37	CH ₂	1.97	(2H, t), <i>J</i> =6.2 Hz
6''	27.34	CH ₂	2.05	(2H, m)
7''	125.02	CH	5.06	(1H, dt), <i>J</i> =1.9, 6.2 Hz
8''	131.74	C		_____
9''	25.75	CH ₃	1.60	(3H, s)
10''	17.68	CH ₃	1.55	(3H, s)

図 3

Compound 2 – 物理化学的特性.

Appearance	yellow powder
Molecular formula	C ₂₅ H ₂₈ O ₆
ESI-MS (m/z)	
Positive:	425.0 (M+H) ⁺
Negative:	423.3 (M-H) ⁻
HRFAB-MS (m/z)	
calcd.:	425.1965(M+H) ⁺
found:	425.1968(M+H) ⁺
UV λ _{max} ^{MeOH} nm (ε)	288.0 (17,935)
IR (KBr) cm ⁻¹	3360, 2960, 2920, 1680, 1600
[α] _D ²⁵ (c 0.2, MeOH)	-17.8°
MP	123~126°C
CD (MeOH) θ /deg	11444 (332), -30028 (292), 7139 (254)

図 4

NMR データ (Compound 2 in acetone-d₆).

Position	¹³ C		¹ H	
2	80.13	CH	5.35	(1H, dd), <i>J</i> =2.9, 12.2 Hz
3	43.54	CH ₂	2.74	(1H, dd), <i>J</i> =2.9, 17.1 Hz
			3.12	(1H, dd), <i>J</i> =12.2, 17.1 Hz
4	197.19	C		_____
5	165.24	C	12.17	(-OH, s)
6	95.81	CH	5.95	(1H, s)
7	167.28	C		_____
8	96.74	CH	5.95	(1H, s)
9	164.31	C		_____
10	103.22	C		_____
1'	130.58	C		_____
2'	112.07	CH	6.91	(1H, d), <i>J</i> =2.2 Hz
3'	145.26	C		_____
4'	144.30	C		_____
5'	129.02	C		_____
6'	119.97	CH	6.81	(1H, d), <i>J</i> =2.2 Hz
1''	28.83	CH ₂	3.38	(2H, d), <i>J</i> =7.3 Hz
2''	123.36	CH	5.38	(1H, m)
3''	136.39	C		_____
4''	16.21	CH ₃	1.73	(3H, s)
5''	40.45	CH ₂	2.06	(2H, t), <i>J</i> =7.5 Hz
6''	27.37	CH ₂	2.12	(2H, td), <i>J</i> =6.8, 7.5 Hz
7''	125.07	CH	5.12	(1H, tq), <i>J</i> =1.5, 6.8 Hz
8''	131.70	C		_____
9''	25.80	CH ₃	1.63	(3H, s)
10''	17.71	CH ₃	1.57	(3H, s)

図 5

Compound 3 – 物理化学的特性.

Appearance	yellow powder
Molecular formula	C ₂₅ H ₂₈ O ₆
ESI-MS (m/z)	
Positive:	425.1 (M+H) ⁺
Negative:	423.2 (M-H) ⁻
UV λ _{max} ^{MeOH} nm (ε)	291.5 (16,833)
IR (KBr) cm ⁻¹	3380, 2960, 2920, 1680, 1600, 1450
[α] _D ²³ (c 0.77, MeOH)	-3.94°
[α] _D ²⁵ (c 0.2, CHCl ₃)	-6.5°
MP	172~175°C
CD (MeOH) θ /deg	9773 (335), -26940 (293), 3399 (255)

図 6

NMR データ (Compound 3 in acetone-d₆).

Position	¹³ C		¹ H	
2	79.85	CH	5.35	(1H, dd), <i>J</i> =3.0, 12.7 Hz
3	43.64	CH ₂	2.71	(1H, dd), <i>J</i> =3.0, 17.1 Hz
			3.12	(1H, dd), <i>J</i> =12.7, 17.1 Hz
4	197.26	C		
5	162.24	C	12.46	(-OH, s)
6	108.99	C		
7	164.76	C		
8	95.27	CH	6.03	(1H, s)
9	161.91	C		
10	103.09	C		
1'	131.69	C		
2'	114.67	CH	7.03	(1H, s)
3'	145.95	C		
4'	146.28	C		
5'	115.97	CH	6.86	(1H, s)
6'	119.18	CH	6.86	(1H, s)
1''	21.53	CH ₂	3.26	(2H, d), <i>J</i> =7.3 Hz
2''	123.44	CH	5.26	(1H, td), <i>J</i> =1.0, 7.3 Hz
3''	134.96	C		
4''	16.18	CH ₃	1.76	(3H, s)
5''	40.46	CH ₂	1.95	(2H, t), <i>J</i> =7.5 Hz
6''	27.38	CH ₂	2.05	(2H, m)
7''	125.12	CH	5.08	(1H, tt), <i>J</i> =1.0, 5.4 Hz
8''	131.54	C		
9''	25.77	CH ₃	1.62	(3H, s)
10''	17.66	CH ₃	1.56	(3H, s)

図 7

Compound 4 – 物理化学的特性.

Appearance	light brown gum
Molecular formula	C ₃₀ H ₃₆ O ₆
FAB-MS (m/z)	
Positive:	493.3 (M+H) ⁺
UV λ _{max} ^{MeOH} nm (ε)	292.0 (20,418)
IR (KBr) cm ⁻¹	3400, 2960, 2920, 1640, 1600
[α] _D ²⁴ (c 0.2, MeOH)	+1.8°
[α] _D ²⁵ (c 0.2, CHCl ₃)	+26.5°
CD (MeOH) θ /deg	8810 (335), -30708 (293), 10510 (257)

図 8

NMR データ (Compound 4 in acetone-d₆).

Position	¹³ C		¹ H	
2	77.12	CH	5.59	(1H, dd), <i>J</i> =2.7, 13.5 Hz
3	43.49	CH ₂	2.65	(1H, dd), <i>J</i> =2.7, 17.2 Hz
			3.14	(1H, dd), <i>J</i> =13.5, 17.2 Hz
4	197.65	C		_____
5	162.27	C	12.47	(-OH, s)
6	108.96	C		_____
7	164.74	C		_____
8	95.29	CH	6.04	(1H, s)
9	162.27	C		_____
10	103.01	C		_____
1'	129.96	C		_____
2'	127.59	C		_____
3'	144.04	C		_____
4'	145.49	C		_____
5'	113.50	CH	6.82	(1H, d), <i>J</i> =8.3 Hz
6'	118.51	CH	6.96	(1H, d), <i>J</i> =8.3 Hz
1''	25.13	CH ₂	3.54	(2H, d), <i>J</i> =6.5 Hz
2''	124.15	CH	5.18	(1H, t), <i>J</i> =6.5 Hz
3''	135.34	C		_____
4''	16.37	CH ₃	1.64	(3H, s)
5''	40.36	CH ₂	1.97	(2H, t), <i>J</i> =7.0 Hz
6''	27.35	CH ₂	2.04	(2H, m)
7''	125.02	CH	5.06	(1H, qt), <i>J</i> =1.2, 7.0 Hz
8''	131.72	C		_____
9''	25.84	CH ₃	1.69	(3H, s)
10''	17.67	CH ₃	1.55	(3H, s)
1'''	21.62	CH ₂	3.26	(2H, d), <i>J</i> =6.6 Hz
2'''	123.61	CH	5.24	(1H, qt), <i>J</i> =1.5, 6.6 Hz
3'''	131.17	C		_____
4'''	25.75	CH ₃	1.61	(3H, s)
5'''	17.81	CH ₃	1.76	(3H, s)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁷ C07D311/32, A61K31/352, A61K7/00, A61P31/04, A61P35/00,
A61P39/06, A23L1/29, C09K15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ C07D311/32, A61K31/352, A61K7/00, A61P31/04, A61P35/00,
A61P39/06, A23L1/29, C09K15/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN),
EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUJIMOTO, Takunori et al., Diversity of propolis., Part 2., Propolis from Japan, Honeybee Science, 2001, 22, No.2, pages 67 to 74	5-7, 9, 10, 14-16, 18, 19 2-4, 8, 11, 13, 17
X	PHILLIPS, William R. et al., C-Geranyl Compounds from Mimulus clevelandii, J. Nat. Prod., 1996, Vol.59, pages 495 to 497	12, 18, 19
X	YAKUSHIJIN, Ken'ichi et al., NEW PRENYLFLAVANONES FROM HERNANDIA NYMPHAEFOLIA (PRESL) KUBITZKI, Heterocycles, 1980, Vol.14, No. 4, pages 397 to 402	18, 19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
06 October, 2004 (06.10.04)Date of mailing of the international search report
26 October, 2004 (26.10.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008964

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BURDOCK, G.A., Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), Food and Chemical Toxicology, 1998, Vol.36, pages 347 to 363	2-4, 8, 11, 13, 17
A	MASUDA, Toshiya et al., Flow Cytometric Estimation on Cytotoxic Activity of Leaf Extracts from Seashore Plants in Subtropical Japan: Isolation, Quantification and Cytotoxic Action of (-)-Deoxypodophyllotoxin, Phytotherapy Research, 2002, Vol.16, pages 353 to 358	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/008964**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008964

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

1. Claims 1-10 relate to 5,7,3',4'-tetrahydroxy-5'-C-geranylflavanone and an antioxidant, antibacterial, antitumor agent, food or beverage, cosmetic, quasi-drug preparation, and medical product each containing the compound.

2. Claim 11 relates to an antioxidant containing at least one flavanone compound selected among nymphaeol-A, nymphaeol-B, and nymphaeol-C, which are known flavanone compounds, while claims 14-19 relate to a food or beverage, cosmetic, quasi-drug preparation, and medical product each containing the antioxidant.

3. Claim 12 relates to an antibacterial containing at least one flavanone compound selected among nymphaeol-A, nymphaeol-B, and nymphaeol-C, which are known flavanone compounds.

4. Claim 13 relates to an antitumor agent containing at least one flavanone compound selected among nymphaeol-A, nymphaeol-B, and nymphaeol-C, which are known flavanone compounds.

These four groups of inventions are not considered to be a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C07D311/32, A61K31/352, A61K7/00, A61P31/04, A61P35/00, A61P39/06, A23L1/29, C09K15/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C07D311/32, A61K31/352, A61K7/00, A61P31/04, A61P35/00, A61P39/06, A23L1/29, C09K15/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS(STN), CAOLD(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	FUJIMOTO, Takunori et al., Diversity of propolis. Part 2. Propolis from Japan, Honeybee Science, 2001, 22, No. 2, pp. 67-74	5-7, 9, 10, 14-16, 18, 19 2-4, 8, 11, 13, 17
X	PHILLIPS, William R. et al., C-Geranyl Compounds from Mimulus clevelandii, J. Nat. Prod., 1996, Vol. 59, pp. 495-497	12, 18, 19

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.10.2004

国際調査報告の発送日

26.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

新 留 素 子

4 P 2939

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	YAKUSHIJIN, Kenichi et al., NEW PRENYLFLAVANONES FROM HERNAN DIA NYMPHAEFOLIA (PRESL) KUBITZKI, Heterocycles, 1980, Vol. 14, No. 4, pp. 397-402	18, 19
Y	BURDOCK, G. A., Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), Food and Chemical Toxicology, 1998, Vol. 36, pp. 347-363	2-4, 8, 11, 13, 17
A	MASUDA, Toshiya et al., Flow Cytometric Estimation on Cytotoxic Activity of Leaf Extracts from Seashore Plants in Subtropical Japan: Isolation, Quantification and Cytotoxic Action of (-)-Deoxypodophyllotoxin, Phytotherapy Research, 2002, Vol. 16, pp. 353-358	1-19

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページに記載

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<第Ⅲ欄の続き>

1. 請求の範囲1-10は、5,7,3',4' -テトラヒドロキシ-5'-C-ゲラニルフラバノン、及び該化合物を含有する抗酸化剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品に関するものである。

2. 請求の範囲11は、公知のフラバノン化合物であるニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種のフラバノン化合物を含有する抗酸化剤に関するものであり、請求の範囲14-19は該抗酸化剤を含有する飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品に関するものである。

3. 請求の範囲12は、公知のフラバノン化合物であるニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種のフラバノン化合物を含有する抗菌剤に関するものである。

4. 請求の範囲13は、公知のフラバノン化合物であるニムフェオールーA、ニムフェオールーB、及びニムフェオールーCから選ばれる少なくとも1種のフラバノン化合物を含有する抗腫瘍剤に関するものである。

そして、これら4つの発明群が单一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとは認められない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.